

亜硝酸捕捉剤チオプロリン投与による 十二指腸胃逆流ラットの胃発癌抑制効果

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

仲 井 培 雄

十二指腸液の逆流により、発癌物質の投与がなくともラットに胃癌が発生する。その発癌機序は明らかではないが、胃内でニトロ化反応が生じ、癌原性ニトロ化合物が生成される説が有力視されている。チオプロリン (thiopropine, TPRO) を経口投与すると、消化管内の亜硝酸を効率的に捕捉し、ニトロチオプロリン (N-nitrosothiopropine, NTPRO) となり、吸収され尿中に排泄される。したがって、尿中 NTPRO は内因性ニトロ化反応の鋭敏な指標として用いられている。この TPRO を用いて、十二指腸胃逆流ラットの胃発癌に与える影響を検索した。体重 270g 前後の Wistar 系雄性ラットを用い、十二指腸液が全て幽門輪を経て胃内へ逆流する手術を行った。TPRO を 0.5% 含有した飼料を与える TPRO 群 (n=13) と、標準飼料を与える対照群 (n=14) の 2 群に分け、術後40週で動物を犠牲死させた。腫瘍、胃癌および胃腺腫の発生率は、TPRO 群でそれぞれ 8% (1/13), 0% (0/13), 8% (1/13) に対し、対照群で 50% (7/14), 36% (5/14), 50% (7/14) と、TPRO 群で低率であった ($p<0.05$)。腫瘍は、幽門前庭部および胃空腸吻合部に発生し、組織学的に癌および腺腫、あるいは両病変の併存であった。胃癌の組織型は管状腺癌または粘液癌で、このうち1個に肝への浸潤がみられた。尿中硝酸排泄量の中央値は、TPRO 群で $4.9\mu\text{mol}/\text{日}$ 、対照群で $5.7\mu\text{mol}/\text{日}$ と差を認めなかったが、尿中 NTPRO 排泄量の中央値は、TPRO 群で $2.0\mu\text{g}/\text{日}$ に対し、対照群では $0.05\mu\text{g}/\text{日}$ の検出限界を下回り、TPRO 群が有意に高かった ($p<0.01$)。以上より、十二指腸胃逆流による胃発癌は、TPRO の投与により抑制され、この発癌には内因性ニトロ化反応が関与することが示唆された。

Key words stomach neoplasms, duodenogastric reflux, endogenous nitrosation, chemoprevention, thiopropine

胃の発癌機構は十分に解明されていないが、胃切除や胃空腸吻合術などの良性疾患に対する手術が、発癌リスクを高めると報告されている^{1,2)}。なかでも幽門側胃切除後の残胃の癌については、Billroth I 法より II 法の発癌リスクが高く^{3,4)}、実験的に十二指腸胃逆流量の増加が残胃発癌に関与することが証明されている⁵⁻⁹⁾。さらに、幽門輪から腺胃に逆流する十二指腸液が、胃癌を発生させ¹⁰⁾、前胃から食道に逆流する十二指腸液が食道癌を発生させる¹¹⁾ことがラットで明らかになっている。

胃発癌の原因として、胃内での発癌物質の生成が示唆されている¹²⁾。すなわち胃酸分泌低下とともに増殖した胃内の硝酸還元菌によって硝酸が亜硝酸に変化し¹³⁻¹⁶⁾、これを基質としてアミンやアミドが結合し¹⁷⁾、癌原性ニトロ化合物が産生される学説¹⁸⁻¹⁹⁾である。さらに、十二指腸胃逆流が、癌原性ニトロ化合物生成への引き金になる可能性が示唆されている¹⁸⁾。

チオプロリン (thiopropine, TPRO) は、システインとホルムアルデヒドの化学的重合により精製される環状の含硫アミノ酸で^{19,20)}、亜硝酸とニトロ化合物前駆体から、癌原性ニトロ化合物の産生を競合阻害する^{21,22)}。一方、ニトロチオプロリン (N-nitrosothiopropine, NTPRO) は、ヒトの体内で産生され、尿中に常時排泄されるニトロ化合物^{23,24)}で、食物内の TPRO やその前駆体から産生される TPRO と亜硝酸から²⁵⁻²⁷⁾、ニトロ

化反応により主に胃内で急速に産生され^{21,28)}、代謝を受けずに大部分が腎より排泄される非変異原性物質である^{21,29)}。したがって、TPRO は効果的な亜硝酸捕捉剤²⁸⁾となり、これを経口投与した際に尿中に排泄される NTPRO はヒトの内因性ニトロ化反応の鋭敏な指標²⁹⁾となる。

そこで本研究では、十二指腸液が幽門より胃に逆流する手術を受けたラットの胃発癌モデル¹⁰⁾に、亜硝酸捕捉剤の TPRO を経口投与し、胃発癌への影響と、尿中 NTPRO の測定による内因性ニトロ化反応の有無を検索したので報告する。

材料および方法

I. 実験動物および飼育条件

体重 270g 前後の Wistar 系雄性ラット (三協ラボサービス、東京) を用い、飼育条件を以下に統一した。ラットを1ケージあたり3匹づつ入れ、室温は $22\pm3^\circ\text{C}$ 、湿度は $55\pm5\%$ に保ち、飼料と水道水を自由摂取とした。実験期間中は、10週毎に体重を測定し、発癌剤の投与はいっさい行わなかった。

II. 実験方法

1. 手術

36時間絶食後、ジエチルエーテルの吸入麻酔下に上腹部正中切開で開腹し、以下の手術を行った。トライツ靱帯より約

平成8年9月10日受付、平成8年10月21日受理

Abbreviations: BrdU, bromodeoxyuridine; CNT, control; GC, gas chromatograph; GCP, gastritis cystica profunda; LI, labeling index; NTPRO, N-nitrosothiopropine; P/W ratio, ratio of thickness of pyloric gland layer to that of whole mucosa at prepyloric area; TEA, thermal energy analyzer; TPRO, thiopropine

4cm 肛門側の空腸を切離後、その口側端を縫合閉鎖し、挙上した肛門側端を腺胃胃底腺領域大弯に端側吻合した。消化管吻合は針付7-0血管縫合用絹糸を用い、8針の全層結節で縫合した(図1)。術後36時間で経口摂取を再開した。

2. 実験群

飼料の種類により、以下の実験群を作成し、術後40週生存ラットを有効動物とした。

1) TPRO 群 (n=18)

手術前は標準飼料 CRF-1 (日本 Charles River, 横浜) を、手術後は CRF-1 に TPRO (東京化成工業, 東京) を 0.5% (W/W) 添加した特殊飼料 (オリエンタル酵母工業, 名古屋) を与えた。

2) 対照群 (n=18)

手術前後を通じて標準飼料 CRF-1 を与えた。

3. 標本採取

犠牲死させる48時間前に、ラットを1匹ずつ代謝ケージに入れ、10N 水酸化ナトリウム溶液 1ml を入れたプラスチック容器で24時間尿を採取し、尿量を記録した。1500rpm で5分間遠心分離して上清を採取し、 -80°C にて冷凍保存した。採尿中は、飼料と水道水を自由摂取とした。

細胞動態の検索は、24時間の絶食後におこなった。すなわち屠殺1時間前に、滅菌精製水で 2mg/ml の濃度に溶解したブロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) (和光, 大阪) 20mg/Kg を腹腔内に投与し、1時間後にジエチルエーテルの吸入による深麻酔で犠牲死させ、直ちに開腹した。胃液と十二指腸液の混合を防ぐため、幽門輪近傍の十二指腸、食道および空腸輸出脚を結紮し、胃および十二指腸を摘出した後、腹腔内臓器を肉眼的に観察した。胃液と十二指腸液を別々に採取し、

pH メーター Model TP-100 (池本理化, 東京) で pH を測定した。

摘出胃は大弯前壁よりで、大弯に沿って切開し、粘膜面を肉眼的に観察した後、コルク板にピンで固定し、10% ホルマリン液で固定した。

4. 病理組織学的検索

摘出胃を 10% ホルマリン液で24時間固定した後、幽門前庭部は小弯に平行に、吻合部は縫合線に直角に 3mm 間隔で、腫瘤が存在する場合には、最大断面が得られるように切り出した。パラフィン包埋後、 $5\mu\text{m}$ で薄切し HE 染色を行い、組織学的に検索した。

5. 病理学的記載

肉眼的に腫瘤(図2)を形成するものの中で、組織学的に腺増生が粘膜下層以下に浸潤し、細胞および構造異型を認めるものを癌(図3, 4)、異型性の弱いものを腺腫(図5)と定義した。胃癌の組織型、深達度などは、第12版胃癌取扱い規約³⁰⁾に準じた。

背景胃粘膜病変として、粘膜下過形成腺管 (gastritis cystica profunda, GCP)、偽幽門腺化生を次のように定義した。GCP は、粘膜下層に小嚢胞状の過形成腺管を認めるもの、偽幽門腺化生は、胃空腸吻合部の腺胃胃底腺領域に幽門腺に似た組織が出現するものとした。

十二指腸液の逆流による幽門腺の萎縮³¹⁾を検索するために、萎縮性胃炎の指標として、幽門腺および粘膜全層の厚さを測定し、その比率である幽門腺粘膜全層比 (ratio of thickness of pyloric gland layer to that of whole mucosa at prepyloric area, P/W ratio) を算定した³¹⁾。観察した腺管は、幽門から 0.9-1.1cm の幽門前庭部粘膜に存在し、癌、腺腫、GCP などから10腺管以上離れたものを選択し、垂直に切り出された完全な形の10個の腺管から、それぞれの厚さとその比を算出し、その平均値から算定した。

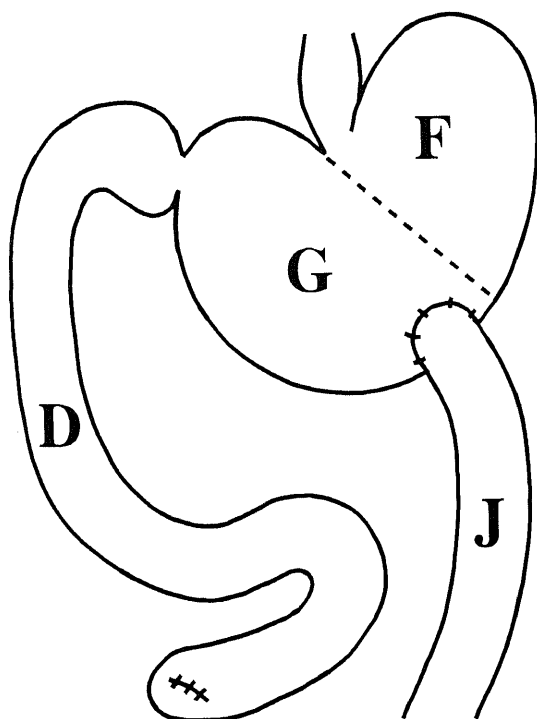


Fig. 1. Schema of duodenogastric reflux procedure. F, forestomach; G, glandular stomach; D, duodenum; J, jejunum.

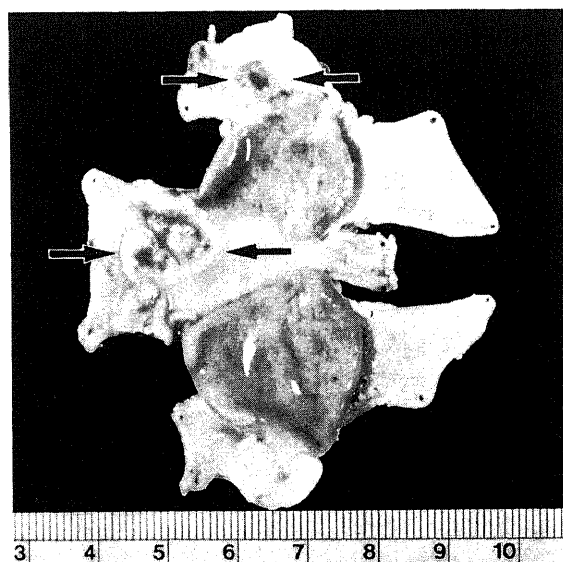


Fig. 2. Macroscopic appearance of gastric carcinoma in a rat fed a standard diet. There are two ulcerated polypoid tumor. One occupies the prepyloric area, and the other does the gastrojejunal stoma.

6. 細胞動態の検索

1) 免疫組織化学染色

鎌田⁹⁾の記載にしたがい、BrdU が取り込まれた細胞核をアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法にて、免疫組織化学染色を行った。摘出した胃のパラフィン包埋切片を脱パラし、2N 塩酸30分間、0.1M ほう酸ナトリウム水溶液10分間、0.05% プロテアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) 加リン酸緩衝液10分間の処理を行い、抗原性を賦活化した。0.3% H₂O₂ 加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼの阻止を行い、2% 正常ヤギ血清加リン酸緩衝液に室温で30分間反応させた後、1次抗体として2% 抗 BrdU モノクローナル抗体 (anti-BrdU Mab, Becton Dickinson, California, USA) 加リン酸緩衝液に室温で2時間反応させた。ついで、2% ビオチン標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) に室温で1時間反応させた後、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (ABCComplex/HRP, DAKO A/S) に室温で30分間反応させた。発色には、3,3'-ジアミノベンチジン (Sigma) を用い、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。

2) 幽門前庭部の増殖帯細胞数およびS期細胞率の算定

鎌田⁹⁾の記載にしたがい、BrdU を用いた標識法で、幽門前庭部の増殖帯 (腺管における最表層標識細胞と最深層標識細胞の

間に存在する細胞) の細胞数と、BrdU 標識率 (BrdU labeling index, BrdU LI) すなわちS期細胞率を、垂直に切り出された完全な形の10個の腺管の平均値から算定した (図6)。観察した腺管は、幽門から0.9-1.1cmの幽門前庭部粘膜に存在するものを選択し、癌、腺腫、GCP などから10腺管以上離れたものとした。

7. 尿中硝酸イオンおよび NTPRO の測定

1) 尿中硝酸イオン

尿中硝酸イオン濃度は、全自動フローインジェクション分析器 TCI-NOX 1000 (東京化成工業) を用いて、Kitajima ら²⁰⁾の記載に基づき測定した。冷凍した尿を室温で解凍し、純水で50倍に希釈した後、キャリア溶液 (東京化成工業) とともにカドミウム-銅還元カラムに送り込むと、尿中の硝酸は亜硝酸に還元される。この亜硝酸を1% スルファニルアミド (東京化成工業) 水溶液と0.1% ナフチルエチレンジアミン (東京化成工業) 水溶液に反応させ、生じた赤色のアゾ化合物を、540nmの吸光度の波長可変可視分光検出器 S-3250 (相馬光学, 東京) で検出した。10μM の硝酸ナトリウム水溶液を標準試料として使用した。

尿中硝酸イオン排泄量は、尿中硝酸イオン濃度に1日尿量と希釈倍率の50を乗じて算出した。

2) 尿中 NTPRO

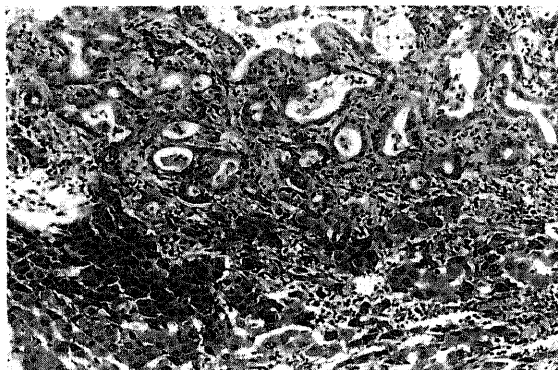


Fig. 3. Histological appearance of the tumor shown in Fig. 2. Tubular adenocarcinoma (top) infiltrates into the hepatic parenchyma (bottom). The nuclei of the tumor cells are irregular in size and shape, and often exhibit mitotic figures. HE, $\times 180$.



Fig. 5. Adenoma of the glandular stomach in a rat fed a standard diet. Glandular proliferations infiltrate into the submucosal layer, but have mild cellular and structural atypism. HE, $\times 110$.

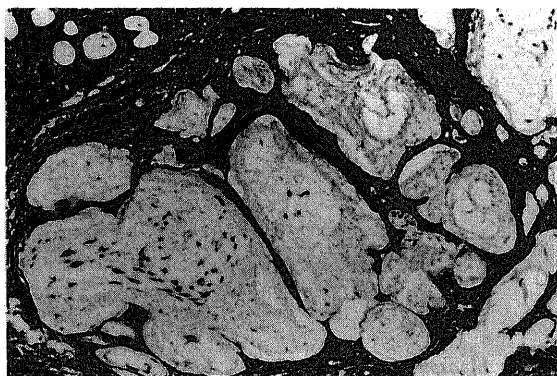


Fig. 4. Mucinous adenocarcinoma of the glandular stomach in a rat fed a standard diet. Mucinous lakes contain the tumor cells featured with bizarre shape. HE, $\times 180$.

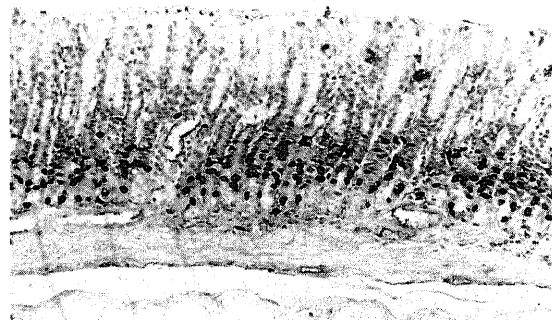


Fig. 6. Glandular atrophy of prepyloric antral mucosa immunostained for bromodeoxyuridine (BrdU) in a rat fed a standard diet. Cells labeled with BrdU in the proliferative zone are identified by an avidin-biotin-peroxidase complex method. $\times 180$.

i. NTPRO の抽出

尿中 NTPRO は Kosaka ら³⁰⁾の方法に準じて抽出した。室温で解凍したラットの尿 2ml に、内部標準試料としての N-ニトロソアゼチジン-2-カルボキシル酸(東京化成工業)を 50ng 添加し、20% の硫酸アンモニウムを含む 2N 硫酸を加えて、pH を 1.5~2 に調整した。充分な塩化ナトリウムで飽和した後、酢酸エチルとメタノールを 9:1 で混合した溶液を 5ml 加えて攪拌し上清を採取、これを 3 回繰り返して NTPRO を抽出した。硫酸ナトリウムで脱し、25% アンモニア水をメタノールで 2.5 倍に希釈した溶液 0.5ml を加えて攪拌した後、40℃ で減圧濃縮、乾固し、メチルエステル化を行う時まで冷蔵保存した。

ii. NTPRO のメチルエステル化

NTPRO のメチルエステル化は、Kosaka ら³⁰⁾の方法にしたがった。まず、メチルエステル化に必要なジアゾメタンを、使用時に以下の方法で調整した。ゴム栓のついた 3 本のガラスフラスコ(それぞれ A, B, C とする)を、A から C まで窒素ガスが通過できるようにガラス管で連結し、A にジエチルエーテル 10ml, B に飽和状態となった水酸化カリウム水溶液 2ml とエタノール 10ml, C に抽出した NTPRO に酢酸エチルとメタノールを 9:1 で混合した溶液を 10ml 加えた溶液を注入した。B に p-トルエンスルホン-N-メチル-N-ニトロソアミド(東京化成工業) 200mg をエチルエーテル 4ml で溶解した液を加えると、ジアゾメタンが発生し、A からゆっくりと送気した窒素ガスで C に運ばれ、NTPRO の溶液が黄色を呈するまでメチルエステル化を行った。40℃ で減圧濃縮、乾固し、2ml のジクロルメタン(和光)による溶解を 3 回繰り返した。脱脂綿で濾過し、40℃ で減圧濃縮、乾固した後、再度 2ml のジクロルメタンで溶解し、40℃ で減圧濃縮、乾固した。試料は、測定時まで -80℃ で冷凍保存した。ジアゾメタンには、発癌性、爆発性があるため、全ての操作は、ドラフト内で行った。

iii. NTPRO の測定

ガスクロマトグラフ(gas chromatograph, GC)に有機窒素酸化物検出装置(thermal energy analyzer, TEA)を結合させた GC-TEA を用いて、Tsuda ら²⁹⁾の既報に準じて測定した。すなわち、ニトロソ化合物をガスクロマトグラフで分離し、その N-NO 基から分離する NO とオゾンを反応させ、生じた化学発光を特異的に検出する方法である。GC-9A ガスクロマトグラフ(島津製作所、京都)の条件は、液相として 5%OV-1(島津製作所)を、担体として Gas-Chrom Q(80-100 mesh, 島津製作所)を充填したガラス製カラム(3.6m×内径 2.6mm)を使用し、カラム温度を 90℃ から 200℃ まで毎分 4℃ で上昇させた。キャリアガスとしてのアルゴンを毎分 40ml で流した。この

GC に TEA Model 543 (Thermo Electron, Waltham, USA) を接続し、クロマトグラムを Chromatopac C-R3A (島津製作所)で記録した。本分析条件での、NTPRO の標準飼料(国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部津田充博博士より御供与)のメチルエステルの保持時間は 21.5 分であった。メチルエステル化された NTPRO を室温で解凍して、100μl のジクロルメタンで溶解し、GC-TEA で分析した。測定した NTPRO は、24 時間尿のうちの 2ml に含まれていた量であり、尿中 NTPRO 排泄量は、測定値に 0.5 と 1 日尿量を乗じて算出した。

III. 統計処理

2 群間の尿中硝酸と NTPRO の排泄量の差の検定には、Mann-Whitney 検定を、それ以外の平均値の差の検定にはまず F 検定を行い、等分散の場合には Student の t 検定を、等分散でない場合には Welch の t 検定を行った。病変の発生率の検定には、Fisher の直接法を行った。危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

成績

I. 手術後体重変化と有効動物数

TPRO 群と対照群の両群間における 10 週毎の体重の平均値には差を認めなかった(表 1)。術後 40 週まで生存した有効動物は、TPRO 群 13 匹、対照群 14 匹で、それ以前に死亡したラットは、TPRO 群 5 匹、対照群 4 匹であった。術後 5 日以内の早期死亡は、TPRO 群 3 匹、対照群 2 匹で、死因は縫合不全、誤嚥であった。術後 20 週未満は、TPRO 群 1 匹、対照群 2 匹で、それ以降は TPRO 群 1 匹で、死因はイレウス、摂食不良による低栄養、誤嚥であった。いずれも腫瘍による死亡は認めなかった。また、痙攣、体重増加不良などの TPRO の副作用は認められなかった。

II. 腫瘍および腫瘍の発生

腫瘍発生率は、TPRO 群は対照群より有意に低率であった(表 2)。TPRO 群の腫瘍は、1 例に 1 個のみ認められ、明瞭な境界を持つ扁平隆起が幽門前庭部に観察された。対照群の腫瘍は 7 例に計 8 個認められ、扁平隆起や中心に不規則な形の潰瘍を伴っている隆起性病変で、幽門前庭部および胃空腸吻合部に観察された(図 2)。これらの腫瘍は、組織学的にいずれも癌か腺腫あるいは両病変の併存であった。

胃癌の発生は、対照群にのみ観察され、TPRO 群では認められず有意に低率であった(表 2)。胃癌を認めた 5 例のうち 1 例は、2 多発癌で幽門前庭部と胃空腸吻合部に存在した(図 2)。発生した癌は、分化型管状腺癌(図 3)と粘液癌(図 4)で、前者が量的に優勢な組織像を示すことが多かった(表 3)。深達度は、全例固有筋層以深で、肝浸潤を 1 例に認めた(表 3、図

Table 1. Changes in body weight after surgery

| Group | No. of animals | Body weight ($\bar{x} \pm SD$, g) | | | | |
|-------|----------------|-------------------------------------|---------------------|----------|----------|----------|
| | | Before surgery | Weeks after surgery | | | |
| | | | 10 | 20 | 30 | 40 |
| TPRO | 13 | 268 ± 30 | 411 ± 27 | 464 ± 36 | 499 ± 42 | 468 ± 43 |
| CNT | 14 | 273 ± 15 | 405 ± 31 | 453 ± 45 | 484 ± 60 | 465 ± 55 |

TPRO group, rats fed a special diet containing TPRO, 0.5% (W/W); CNT group, rats fed a standard diet.

3). 肝およびリンパ節転移, 腹膜播種は認めなかった。

腺腫の発生率は, TPRO 群は, 対照群より有意に低率であった (表 2)。腺腫は 8 例 9 個に認められ, 腺腫単独 (図 5) 4 個と, 癌と並存する腺腫 5 個に分けられた。後者は対照群にのみ観察された。

Table 2. Histological findings of tumors of glandular stomach

| Group | No. of animals | No. (%) of animals bearing | | |
|-------|----------------|----------------------------|---------------------|---------|
| | | Tumor | Carcinoma | Adenoma |
| TPRO | 13 | 1 (8)* | 0 (0)* | 1 (8)* |
| CNT | 14 | 7 (50) | 5 (36) ^a | 7 (50) |

^a There was one rat with double cancers.

* $P < 0.05$ compared by Fisher's exact probability test.

TPRO group, rats fed a special diet containing TPRO, 0.5% (W/W); CNT group, rats fed a standard diet.

Ⅲ. 背景胃粘膜病変

背景胃粘膜における GCP の発生率は, 幽門前庭部と胃空腸吻合部で, 両群間に差を認めなかった (表 4)。胃空腸吻合部の偽幽門腺化生の発生率は, 両群間に差を認めなかった (表 4)。

Ⅳ. 萎縮性胃炎

幽門前庭部における幽門腺と粘膜全層の厚さおよび P/W ratio は, 両群間に差を認めなかった (表 5)。

Ⅴ. 細胞動態

幽門前庭部の増殖帯細胞数と BrdU LI は, 両群間に差を認めなかった (表 6, 図 6)。

Ⅵ. 胃・十二指腸液の pH

胃液 pH は, TPRO 群は 3.6 ± 0.7 , 対照群は 3.5 ± 0.5 で, 十二指腸液 pH は, TPRO 群は 6.7 ± 0.1 , 対照群は 6.7 ± 0.2 で, 各々両群間に差を認めなかった。

Ⅶ. 尿中硝酸および NTPRO の排泄量

尿中 NTPRO 排泄量の中央値 (最低値—最高値) は, TPRO 群で $2.0 \mu\text{g}/\text{日}$ ($0.6-5.3$) に対し, 対照群では $0.05 \mu\text{g}/\text{日}$ の検出限界を下回り (0.05 以下— 0.2), TPRO 群が有意に高かった。

Table 3. Location, histological type and depth of invasion of gastric carcinomas in CNT group

| No. of carcinomas | Location | | Histological type | | Depth of invasion | | | |
|-------------------|-----------------|---------------------|-------------------|-----|-------------------|----|----|-----------------|
| | Prepyloric area | Gastrojejunal stoma | tub | muc | mp | ss | se | si ^a |
| 6 ^b | 5 | 1 | 4 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |

^a Infiltrating into the liver

^b There was one rat with double cancers.

CNT group, rats fed a standard diet; tub, tubular adenocarcinoma; muc, mucinous adenocarcinoma; mp, muscularis propria; ss, subserosa; se, serosa exposed; si, serosa infiltrating.

Table 4. Incidence of gastritis cystica profunda and pseudopyloric metaplasia in glandular stomach

| Group | No. of animals | No. (%) of gastritis cystica profunda at | | No. (%) of pseudopyloric metaplasia at |
|-------|----------------|--|---------------------|--|
| | | Prepyloric area | Gastrojejunal stoma | Gastrojejunal stoma |
| TPRO | 13 | 7 (54) | 2 (15) | 3 (23) |
| CNT | 14 | 8 (57) | 2 (14) | 4 (29) |

TPRO group, rats fed a special diet containing TPRO, 0.5% (W/W); CNT group, rats fed a standard diet.

Table 5. Thickness of pyloric gland layer and whole mucosa of prepyloric antral mucosa and P/W ratio

| Group | No. of animals | Thickness ($\bar{x} \pm \text{SD}$, μm) of | | P/W ratio ($\bar{x} \pm \text{SD}$) |
|-------|----------------|--|--------------|---------------------------------------|
| | | Pyloric gland layer | Whole mucosa | |
| TPRO | 13 | 92 ± 7 | 227 ± 18 | 0.40 ± 0.03 |
| CNT | 14 | 94 ± 11 | 237 ± 20 | 0.41 ± 0.03 |

P/W ratio, ratio of thickness of pyloric gland layer to that of whole mucosa at prepyloric area; TPRO group, rats fed a special diet containing TPRO, 0.5% (W/W); CNT group, rats fed a standard diet.

Table 6. Cell count and labeling index in proliferative zone in prepyloric antral mucosa

| Group | No. of animals | Cell count ($\bar{x} \pm \text{SD}$) | BrdU labelling index ($\bar{x} \pm \text{SD}$, %) |
|-------|----------------|--|---|
| TPRO | 13 | 26.7 ± 5.1 | 40.5 ± 5.3 |
| CNT | 14 | 28.2 ± 4.8 | 41.5 ± 4.5 |

TPRO group, rats fed a special diet containing TPRO, 0.5% (W/W); CNT group, rats fed a standard diet.

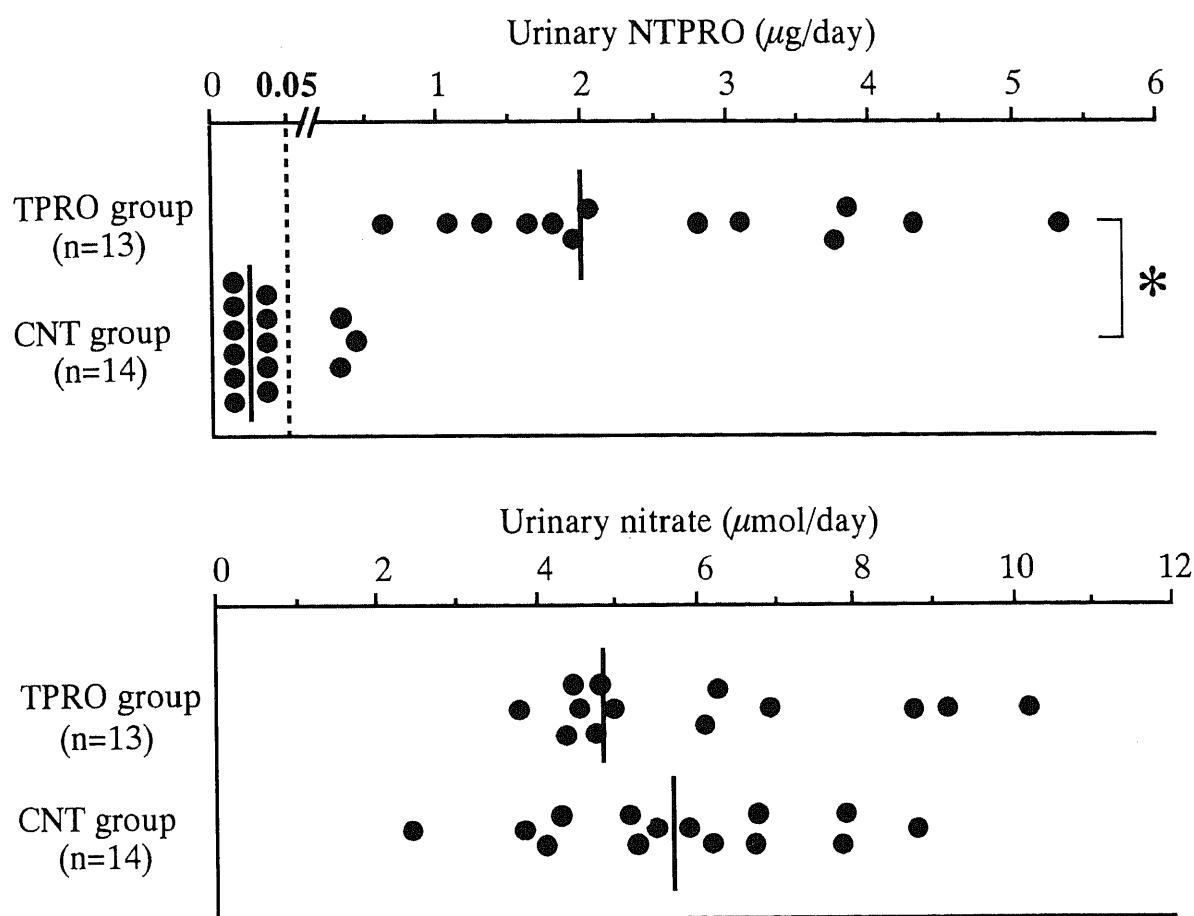


Fig. 7. Urinary excretion of N-nitrosothiopropine (NTPRO) and nitrate. The urinary excretion of NTPRO in the TPRO group is significantly higher than that in the CNT group ($P < 0.01$). However, urinary excretion of nitrate is similar in the two groups. TPRO group, rats receiving a special diet containing thiopropine; CNT group, rats receiving a standard diet; The broken line indicates the detection limit ($< 0.05 \mu\text{g/day}$) of urinary excretion of NTPRO. Each bar indicates the median count. * $P < 0.01$, compared by Mann-Whitney test.

た ($p < 0.01$, 図 7)。尿中硝酸排泄量の中央値 (最低値—最高値) は, TPRO 群で $4.9 \mu\text{mol/日}$ ($3.7-10.2$), 対照群で $5.7 \mu\text{mol/日}$ ($2.4-8.8$) と差を認めなかった (図 7)。

考 察

本実験では, Wistar 系雄性ラットに, 十二指腸の遠位側を盲端にし十二指腸液を幽門から胃に逆流させる手術を行い¹⁰⁾, 十二指腸胃逆流ラットを作成した。発癌剤を投与せずに術後40週間観察し, TPRO の投与が, 胃癌の発生に及ぼす影響を観察した。その結果, TPRO の投与により, 十二指腸胃逆流による胃発癌が抑制され, 尿中 NTPRO 排泄量が著明に増加することが明らかとなった。

TPRO は, 亜硝酸を捕捉し, 癌原性ニトロソ化合物を競合阻害する作用を持つ。ラットに N-ベンジルメチラミンと亜硝酸を投与すると, 胃内で N-ニトロソベンジルメチラミンとなり, 前胃に扁平上皮癌が発生する³⁰⁾。Tahira らは, 試験管内で, 両物質に TPRO を加えると, N-ニトロソベンジルメチラミンの生成を競合阻害し³¹⁾, ラットに, 両物質と TPRO を同時に投与すると前胃癌の発生を抑制することを観察している²⁹⁾。

著者の実験では, 尿中硝酸排泄量は, 両群間で差を認めなかった。両群の飼料と飲料水は TPRO の添加以外は均一で, 発

育曲線に差異が見られなかったことより, 両群ラットの硝酸摂取量は著しい違いはないものと推測される。そして, 実験群では TPRO の投与により尿中 NTPRO の排泄量が有意に増加し, 胃癌の発生が抑制された。この事実は, 十二指腸胃逆流ラットの体内では, 亜硝酸を基質とする癌原性ニトロソ化合物が生成され, TPRO はこの生成を競合的に阻害したと考えるのが妥当である。

この実験で特徴的なことは, TPRO 群の発癌が抑制されたが, これに伴って, GCP や胃炎, 細胞動態の変化など胃発癌に関連する病変の発生率は低下しなかったことである。このことは, これまでの十二指腸胃逆流による発癌率の比較実験での成績とは異なる⁹⁾¹⁰⁾³⁵⁾³⁶⁾。すなわち, GCP は, ヒトの胃粘膜下に嚢胞状の拡張腺管を形成する病変として, Franzin ら³⁷⁾により記載され, Billroth II 法残胃^{38)~40)}や胃空腸吻合術⁴¹⁾の吻合部における発癌の準備状態と推測されている。ラットにおける胃腸吻合部粘膜の観察から, 鎌田⁹⁾は, Billroth II 法と I 法を比較し, 癌や GCP の発生率の増加, 腺窩上皮の過形成と胃底腺の萎縮, 細胞増殖帯の拡大を報告している。Langhans ら³⁹⁾は, Billroth II 法や胃空腸吻合術では, Roux en Y 法や Billroth I 法より発癌率や ³H-チミジン LI は高く, 十二指腸胃逆流の程度と関連すると報告している。Taylor ら³⁸⁾は, 胃空腸吻合術では胃切開縫

合術より、発癌率、腺頸部の過形成、オルニチン脱炭酸酵素活性値と³H-チミジン LI の増加を観察している。また、Miwa ら¹⁸は、胃切開縫合術を行ったラットに比べ、吻合操作を行っていない十二指腸胃逆流ラットの幽門前庭部で、癌およびGCP の発生増加と幽門腺の萎縮を認めている。

Imai ら⁴²によるとこれらの病変は可逆性で、ラットにBillroth II 法を行った後でRoux en Y法に再手術すると、異型の腺増生やBrdU LI の増加が元に戻り、十二指腸胃逆流量の減少に伴い、その発生率が低下するとしている。このことは、上記病変は、癌関連病変ではあっても、必ずしも発癌へと進展しないことを示しているのかもしれない。

Reed ら¹⁴は、胃切除後症例は、正常人に比べて、胃内のpH、硝酸還元菌数、亜硝酸およびニトロソ化合物濃度が有意に高く、胃癌症例と良く似た値をとると報告している。これに基づき、Watt ら¹⁸は、十二指腸液による胃発癌機構について、次のように記載している。胃の手術によって引き起こされる十二指腸液の胃内逆流は、胃内 pH の上昇と細菌増殖を引き起こす⁴³。このような環境下では、硝酸還元菌が唾液や食事の硝酸を亜硝酸に変える^{14,43,44}。この胃内亜硝酸がアミンやアミドと化学的に反応し¹⁷、癌原性ニトロソ化合物を生成する¹⁴。実際、松本⁴⁵は、十二指腸胃逆流ラットの胃と十二指腸液内に、硝酸還元菌と変異原性物質の存在を観察し、発癌のイニシエーションと癌原性ニトロソ化合物の関与を示唆している。

さて、前述の如く Watt ら¹⁸は、ヒトの残胃癌で、癌原性ニトロソ化合物は残胃内で生成されると推測している。TPRO のニトロソ化は、一般に胃内で化学的におこるとされ、至適 pH は2.5以下である^{21,22}。しかし、pH が3.5-3.6である本実験ラットの胃内は、至適環境とはいえない⁴⁶。Calmels ら⁴⁷は、TPRO、亜硝酸、オメブラゾール、大腸菌を投与したラット(胃内 pH 6.7)は、TPRO、亜硝酸を投与したラット(胃内 pH 2)より体内 NTPRO 産生量が5倍になると報告した。さらに、緑膿菌からニトロソ化合物合成酵素を分離同定⁴⁸しており、NTPRO の産生増加は、この酵素の作用によると推測した。このように、TPRO のニトロソ化は、化学的(至適 pH 2.5 以下)だけでなく、細菌酵素(至適 pH 7)によっても触媒される。松本⁴⁵は、十二指腸胃逆流ラットで、硝酸還元菌と変異原性物質の存在は、胃内だけでなく十二指腸盲管内にも認めたとしている。著者ら⁴⁹は、ラットに幽門形成術と胃空腸吻合術を行い、発癌率の高かった胃空腸吻合術では、胃内だけでなく十二指腸盲係蹄内にも硝酸還元菌と亜硝酸イオンの増加を認めた。さらに、佐原⁵⁰は、胃を全摘して十二指腸を盲管にした後、上部空腸を食道に端側吻合したラットに食道癌ができることを認めており、癌原性物質の産生に胃の存在が必要ないことを観察した。これらの事実から、癌原性物質は必ずしも胃とは限らず、小腸でも生成されることが示された。

TPRO は、発癌物質が胃粘膜細胞に障害を与える過程の阻害物質すなわち遮断因子⁵¹や、癌細胞の分化誘導剤⁵²として作用する可能性が指摘されている。TPRO は過去に肝疾患の治療薬として使用されており、その機序として、代謝産物であるシステインの細胞内濃度を増加させ肝細胞の防御能を強めることが推測されている⁵³。Giorgi ら⁵⁴は、システインから生成され、遮断因子であるグルタチオンに注目し、TPRO を投与したラットで、胃粘膜内の濃度を測定した。しかし、その濃度は、わずかに上昇するものの一過性で、引き続き低濃度が遷延すること、

TPRO の投与量が800mg/kgと高濃度なため死亡率が43%と非常に高いことを報告している。したがって、遮断因子としての効果はほとんどないと考えられる。また、Brugarolas ら⁵⁵は、TPRO は、ヒトの進行頭頸部癌の扁平上皮癌細胞を正常細胞に分化誘導すると報告したが、追試⁵⁵⁻⁵⁸では全くその効果は確認されていない。

TPRO をヒトに投与すると、ニトロソ化されなかったものは消化管から迅速に吸収され⁵⁹、肝臓で代謝を受け、システインとホルムアルデヒドになり、さらに蟻酸を経て、二酸化炭素と水になる⁵⁹。ホルムアルデヒドが過剰に産生された場合や、血液脳関門の機能が十分でない場合⁵⁹には、副作用が発現する。TPRO を10-60mg/kg/日投与すると、中枢神経系に作用し、痙攣、せん妄、振戦等を引き起こし、死に至ることがある^{55,56,60}。また、クレアチニンの上昇⁵⁶や、高血糖^{55,60}等が報告されている。一方、TPRO に対するラットの LD50 は875±20mg/kgであり、高血糖や痙攣を引き起こすが、300mg/kg/日では、死亡は認められない⁵⁴。幼若なラットに TPRO を150mg/kg/日投与すると中等度の発育障害を引き起こす⁶¹。

ニトロソ化合物の生成には、亜硝酸とともに、前駆体としてのアミンやアミドが必要となる。十二指腸胃逆流ラットでは、どのような前駆体が考えられるであろうか。Mason⁸や小島ら⁶¹は、ラットに、胆汁と脾液のどちらか一方を胃に逆流させる分流手術を行うと、切除胃に脾液を逆流させた場合に胃癌の発生を認めるとした。しかし、藤村⁶²は、本実験ラットと同じモデルで分流手術を行い、胆汁を逆流させた場合に胃癌が発生すると報告した。藤村と Mason や小島らには意見の食い違いがあり、その原因ははっきりしない。しかし、脾液を構成する物質から癌原性物質が発見または誘導されたとする報告はないが、胆汁酸からは、N-ニトロソグリココール酸やN-ニトロソタウロコール酸など⁶³のラットの胃や肝臓に対して癌原性を持つ物質⁶⁴が生成されている。胆汁やその成分の胆汁酸は、本実験ラットの胃発癌に重要で、プロモーター作用⁶⁵⁻⁶⁸、補癌原性作用^{69,70}としてだけでなく、癌原性ニトロソ化合物生成のためのアミドの供給源としても重要と推測される。

亜硝酸捕捉剤である TPRO は、競合作用を利用した発癌阻害物質として臨床応用の可能性が期待できる。最小有効濃度の設定、副作用の発現濃度など、さらに実験を進める必要がある。

結 論

ラットに、十二指腸の遠位側を盲端にして十二指腸液を幽門から胃に逆流させる手術を行い、発癌剤を投与せずに術後40週間観察し、術後に与える飼料の種類により、TPRO 0.5% 含有標準飼料の TPRO 群(n=13)と、標準飼料の対照群(n=14)を作成した。TPRO の投与により、胃発癌抑制効果と内因性ニトロソ化反応の有無を検索し、以下の結果が得られた。

1. 腫瘍の発生率は、TPRO 群は8%で、対照群の50%より有意に低値を示した(p<0.05)。

2. 胃癌は、TPRO 群は認められなかったのに対し、対照群は36%に認められ、その発生率は TPRO 群が有意に低率であった(p<0.05)。組織型は分化型管状腺癌または粘液癌で、深達度は全て固有筋層以深で、1例は肝に浸潤していた。

3. 胃腺腫の発生率は、TPRO 群は8%で、対照群の50%より有意に低値を示した(p<0.05)。

4. 背景胃粘膜における GCP の発生率は、幽門前庭部で、TPRO 群は 54%, 対照群は 57%, 胃空腸吻合部で、TPRO 群は 15%, 対照群は 14% と、各々両群間に差を認めなかった。

5. 幽門前庭部の非腫瘍部粘膜における、幽門腺の厚さは、TPRO 群 $92 \pm 7 \mu\text{m}$, 対照群 $94 \pm 11 \mu\text{m}$, 粘膜全層の厚さは、TPRO 群 $227 \pm 18 \mu\text{m}$, 対照群 $237 \pm 20 \mu\text{m}$ で、両群間で差を認めなかった。幽門腺の萎縮の程度を幽門腺と粘膜全層の厚さの比で見でみると、TPRO 群 0.40 ± 0.03 , 対照群 0.41 ± 0.03 で差を認めなかった。

6. 幽門前庭部の非腫瘍部粘膜における、増殖帯細胞数は、TPRO 群 26.7 ± 5.1 , 対照群 28.2 ± 4.8 , BrdU LI は、TPRO 群 $40.5 \pm 5.3\%$, 対照群 $41.5 \pm 4.5\%$ で、両群間で差を認めなかった。

7. 尿中硝酸排泄量の中央値は、TPRO 群は $4.9 \mu\text{mol}/\text{日}$, 対照群は $5.7 \mu\text{mol}/\text{日}$ と差を認めなかったが、尿中 NTPRO 排泄量の中央値は、TPRO 群は $2.0 \mu\text{g}/\text{日}$ と、対照群の検出限界以下より有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

8. 体重の変化、胃および十二指腸液の pH は、両群間に有意差を認めなかった。

以上より、十二指腸胃逆流による胃発癌は TPRO の投与により抑制され、この発癌には内因性ニトロ化反応が関与することが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御懇意なる、御指導、御校閲を賜った恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、直接御指導を頂いた当教室三輪晃一助教授、国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部津田充有博士、ならびに、御教示、御助言を頂いた本学薬学部衛生化学教室早川和一教授、木津良一助手、病理学的検討に御教示を頂いた滋賀医科大学第一病理学教室服部隆則教授に深謝いたします。さらに、本研究に御協力頂いた教室の諸兄に深謝いたします。

本論文の要旨は、第54回日本癌学会総会(京都、1995)、第3回日本癌予防研究会(名古屋、1996)において発表した。

文 献

- 1) Stalsberg H, Taksdal S. Stomach cancer following gastric surgery for benign conditions. *Lancet* ii : 1175-1177, 1971
- 2) Viste A, Bjørnstad P, Opheim P, Skarstein A, Thunold J, Hartveit F, Eide GE, Eide TJ. Risk of carcinoma following gastric operations for benign disease. A historical cohort study of 3470 patients. *Lancet* ii : 502-504, 1986
- 3) Orlando R, Welch JP. Carcinoma of the stomach after gastric operation. *Am J Surg* 141 : 487-491, 1981
- 4) Caygill CPJ, Hill MJ, Kirkham JS, Northfield TC. Mortality from gastric cancer following gastric surgery for peptic ulcer. *Lancet* i : 929-931, 1986
- 5) Langhans P, Heger RA, Hohenstein J, Schlake W, Bunte H. Operation-sequel carcinoma of the stomach. Experimental studies of surgical techniques with or without resection. *World J Surg* 5 : 595-605, 1981
- 6) Kondo K, Suzuki H, Nagayo T. The influence of gastro-jejunal anastomosis on gastric carcinogenesis in rats. *Gann* 75 : 362-369, 1984
- 7) Theuring F, Dittrich S, Wolter H. On the varying degrees of cancerogenicity of modified gastroentero-anastomoses. *Exp Pathol* 27 : 179-184, 1985
- 8) Mason RC. Duodenogastric reflux in rat gastric carcinoma. *Br J Surg* 73 : 801-803, 1986
- 9) 鎌田 徹. 残胃の発癌に関する実験的検討. —Billroth I 法と Billroth II 法吻合の比較—. *日外会誌* 94 : 1-10, 1993
- 10) Miwa K, Hasegawa H, Fujimura T, Matsumoto H, Miyata R, Kosaka T, Miyazaki I, Hattori T. Duodenal reflux through the pylorus induces gastric adenocarcinoma in the rat. *Carcinogenesis* 13 : 2313-2316, 1992
- 11) 瀬川正孝. 胃十二指腸液逆流によるラットの食道発癌実験. *日消外会誌* 26 : 971-974, 1993
- 12) Correa P, Haenzel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* ii : 58-60, 1975
- 13) Ruddle WS, Bone ES, Hill MJ, Blendis LM, Walters CL. Gastric juice nitrite: a risk factor for cancer in the hypochlorhydric stomach? *Lancet* ii : 1037-1039, 1976
- 14) Reed PI, Smith PLR, Haines K, House FR, Walters CL. Gastric juice N-Nitrosamines in health and gastroduodenal disease. *Lancet* ii : 550-552, 1981
- 15) Stockbrugger RW, Cotton PB, Eugenides N, Bartholomew BA, Hill MJ, Walters CL. Intragastric nitrites, nitrosamines and bacterial overgrowth during cimetidine treatment. *Gut* 23 : 1048-1054, 1982
- 16) Schlag P, Böckler R, Peter M. Nitrite and nitrosamine in gastric juice: risk factors for gastric cancer? *Scand J Gastroenterol* 17 : 145-150, 1982
- 17) Mirvish SS. Formation of N-Nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 31 : 325-351, 1975
- 18) Watt PC, Sloan JM, Donaldson JD, Patterson CC, Kennedy TL. Relationship between histology and gastric juice pH and nitrite in the stomach after operation for duodenal ulcer. *Gut* 25 : 246-252, 1984
- 19) Schubert MP. Compounds of thiol acids with aldehydes. *J Biol Chem* 114 : 341-350, 1936
- 20) Ratner S, Clarke HT. The action of formaldehyde upon cysteine. *J Am Chem Soc* 59 : 200-206, 1937
- 21) Tahira T, Tsuda M, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T. Kinetics of nitrosation of thioproline, the precursor of a major nitroso compound in human urine, and its role as a nitrite scavenger. *Gann* 75 : 889-894, 1984
- 22) Tahira T, Ohgaki H, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T. The inhibitory effect of thioproline on carcinogenesis induced by N-benzylmethylamine and nitrite. *Fd Chem Toxicol* 26 : 511-516, 1988
- 23) Tsuda M, Hirayama T, Sugimura T. Presence of N-nitroso-L-thioproline and N-nitroso-L-methylthioproline in human urine as major N-nitroso compounds. *Gann* 74 : 331-333, 1983
- 24) Ohshima H, Friesen M, O'Neill IK, Bartsch H. Presence in human urine of a new N-nitroso compound, N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid. *Cancer Lett* 20 : 183-190, 1983

- 25) Ohshima H, O'Neill IK, Friesen M, Berezziat JC, Bartsch H. Occurrence in human urine of new sulphur-containing N-nitrosamino acids N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid and its 2-methyl derivative, and their formation. *J Cancer Res Clin Oncol* 108: 121-128, 1984
- 26) Tsuda M, Frank N, Sato S, Sugimura T. Marked increase in the urinary level of N-nitrosothioproline after ingestion of cod with vegetables. *Cancer research* 48: 4049-4052, 1988
- 27) Kurashima Y, Tsuda M, Sugimura T. Marked formation of thiazolidine-4-carboxylic acid, an effective nitrite trapping agent in vivo, on boiling of dried shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J Agric Food Chem* 38: 1945-1949, 1990
- 28) Tsuda M, Kurashima Y. Nitrite-trapping capacity of thioproline in the human body. In O'Neill IK, Chen J, Bartsch H (eds), *Relevance to Human Cancer of N-Nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins*, No. 57, p123-128, IARC Sci Publ, Lyon, 1991
- 29) Tsuda M, Niitsuma J, Sato S, Hirayama T, Kakizoe T, Sugimura T. Increase in the levels of N-nitrosoproline, N-nitrosothioproline and N-nitroso-2-methylthioproline in human urine by cigarette smoking. *Cancer letters* 30: 117-124, 1986
- 30) 胃癌組織分類検討委員会. 胃癌の組織学的分類. 胃癌取り扱い規約(胃癌研究会編), 改訂第12版, 60-89頁, 金原出版, 東京, 1993
- 31) 浜口榮祐. 慢性胃炎の外科的療法について. 慢性胃炎(岸川基明, 村上忠重編), 第1版, 242-264頁, 医学書院, 東京, 1970
- 32) Kitajima S, Tsuda M, Eshita N, Matsushima Y, Saito M, Momma J, Kurokawa Y. Lipopolysaccharide-associated elevation of serum and urinary nitrite/nitrate levels and hematological changes in rats. *Toxicol lett* 78: 135-140, 1995
- 33) Kosaka H, Tsuda M, Kurashima Y, Esumi H, Terada N, Ito Y, Uozumi M. Marked nitrosation by stimulation with lipopolysaccharide in ascorbic acid-deficient rats. *Carcinogenesis* 11: 1887-1889, 1990
- 34) Fong LYY, Lee JSK, Chan WC, Newberne PM. Zinc deficiency and the development of esophageal and forestomach tumors in Sprague-Dawley rats fed precursors of N-nitroso-N-benzylmethylamine. *J Natl Cancer Inst* 72: 419-423, 1984
- 35) Langhans P, Bues M, Heger RA, Hohenstein J, Korfsmeier KH. Cell-kinetic investigation in the operated rat stomach to show the influence of duodenogastric reflux. An experimental long-term study. *Scand J Gastroenterol Suppl* 92: 87-90, 1984
- 36) Taylor PR, Mason RC, Filipe MI, Vaja S, Hanley DC, Murphy GM, Dowling RH, McColl I. Gastric carcinogenesis in the rat induced by duodenogastric reflux without carcinogens: morphology, mucin histochemistry, polyamine metabolism and labeling index. *Gut* 32: 1447-1454, 1991
- 37) Franzin G, Novelli P. Gastritis cystica profunda. *Histopathology* 5: 535-547, 1981
- 38) 岩下明德, 黒岩重和, 遠城寺宗知, 山田寛保, 朔元則. Stomal polypoid hypertrophic gastritis (SPHG) (gastritis cystica polyposa; GCP) に発生したI型早期胃癌の1例. 胃と腸 17: 1333-1339, 1982
- 39) 鈴木恵子, 山道昇, 松能久雄, 小西二三男. Gastritis cystica polyposa を基盤として発生した残胃早期胃癌の検討. 金医大誌 10: 128-134, 1985
- 40) 榎本 悟, 奈良芳則, 大黒善弥, 原 敬治, 岩淵三哉, 渡辺英伸. Stomal polypoid hypertrophic gastritis に発生した残胃癌の1例. *Gastroenterol Endosc* 29: 1196-1203, 1987
- 41) 西土井英昭, 石黒 稔, 工藤浩史, 村上 敏, 正木忠夫, 谷口 遥. 先天性肥厚性幽門狭窄症に対する胃空腸吻合術後に発生した胃癌の1例. 日消外会誌 26: 1053-1056, 1993
- 42) Imai T, Kobayasi S, Rodrigues MAM, de Camargo JLV, Ogawa K, Iwata H, Tatematsu M. Reduction of cell proliferative activities of gastric stump adenomatous hyperplasias after bile reflux diversion in rats. *Carcinogenesis* 14: 1765-1769, 1993
- 43) Muscroft TJ, Deane SA, Youngs D, Burdon DW, Keighley MRB. The microflora of the postoperative stomach. *Br J Surg* 68: 560-564, 1981
- 44) Carboni M, Guanagni S, Pistoia MA, Amicucci G, Tuscano D, Negro P, Smith PLR, Walters CL. The microflora of the gastric juice after Billroth I and Billroth II partial gastrectomy. *Scand J Gastroenterol* 21: 461-470, 1986
- 45) 松本 尚. 逆流によるラット胃癌発生に関する研究—胃・十二指腸液の変異原性について—. 日外会誌 95: 368-375, 1994
- 46) Kyrtopoulos SA, Daskalakis G, Outram JR. Studies in gastric carcinogenesis. III. The kinetics of nitrosation of gastric-juice components in vitro and their implications for the in vivo formation of N-nitroso compounds in normal and in hypochlorhydric populations. *Carcinogenesis* 6: 1141-1145, 1985
- 47) Calmels S, Bérézziat JC, Ohshima H, Bartsch H. Bacterial formation of N-nitroso compounds from administered precursors in the rat stomach after omeprazole-induced achlorhydria. *Carcinogenesis* 12: 435-439, 1991
- 48) Calmels S, Venezia ND, Bartsch H. Isolation of an enzyme catalyzing nitrosamine formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria mucosus*. *Biochem Biophys Res Com* 171: 655-660, 1990
- 49) 仲井培雄, 三輪晃一, 木南伸一, 佐原博之, 松本 尚, 瀬川正孝, 鎌田 徹, 長谷川啓, 藤村 隆, 宮田龍和, 谷卓, 八木雅夫, 宮崎逸夫, 中村信一, 津田充有, 服部隆則. 胃手術後の十二指腸液逆流と前腸(食道・胃)発癌. 消化器癌の発生と進展 7: 89-92, 1995
- 50) 佐原博之. 逆流による食道発癌の実験的研究—胃液と十二指腸液の分離逆流—. 日消外会誌 28: 1630-1640, 1995
- 51) Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Research* 45: 1-8, 1985
- 52) Brugarolas A, Gosalvez M. Treatment of cancer by an inducer of reverse transformation. *Lancet* 1: 68-70, 1980
- 53) Weber HU, Fleming JF, Miquel J. Thiazolidine-4-carb-

- oxylic acid, a physiologic sulfhydryl antioxidant with potential value in geriatric medicine. *Arch Gerontol Geriatr* 1: 299-310, 1982
- 54) Giorgi G, Martini P, Micheli L, Segre G. Thiazolidine-4-carboxylic acid toxicity and glutathione levels in various organs of the rat. *Drugs Exptl Clin Res* XIII: 399-405, 1987
- 55) Newman RA, Hacker MP, McCormack JJ, Krakoff IH. Pharmacologic and toxicologic evaluation of thioproline: a proposed nontoxic inducer of reverse transformation. *Cancer Treatm Rep* 64: 837-844, 1980
- 56) Garnier R, Conso F, Efthymiou ML, Fournier E. Thioproline. *Lancet* 1: 365, 1980
- 57) Sappino AP, Smith IE. Thioproline in squamous cell cancer. *Lancet* 2: 417, 1980
- 58) Nasca S, Galichet V, Jardillier JC, Garbe E, Coninx P. Thioproline toxicity. *Lancet* 1: 778, 1981
- 59) Harmand MF, Blanquet P. Pharmacokinetics and metabolism of [³⁵S]-thiazolidine carboxylic acid in the rat. I elimination and distribution. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 7: 323-327, 1982
- 60) Kahn RS, Anthony SM. Acute poisoning with thiazolidine carboxylic acid. *Clin Toxicol* 18: 527-530, 1981
- 61) 小島 宏, 近藤 建, 高木 弘. 残胃癌発生に関する実験的研究. *日外会誌* 91: 818-826, 1990
- 62) 藤村 隆. 十二指腸液胃逆流によるラット胃発癌. 一胆汁, 膵液の分離逆流モデルによる検討. *日外会誌* 92: 933-939, 1991
- 63) Shuker DEG, Tannenbaum SR, Wishnok JS. N-nitroso bile acid conjugates. 1. synthesis, chemical reactivity, and mutagenicity. *J Org Chem* 46: 2092-2096, 1980
- 64) Busby Jr WF, Shuker DEG, Charnley G, Newberne PM, Tannenbaum SR, Wogan GN. Carcinogenicity in rats of the nitrosated bile acid conjugates N-nitrosoglycocholic acid and N-nitrosotaurocholic acid. *Cancer Res* 45: 1367-1371, 1985
- 65) 宮田龍和. 十二指腸胃逆流の胃発癌促進作用. *日消外会誌* 21: 1357-1362, 1988
- 66) Furihata C, Takezawa R, Matsushima T, Tatematsu M. Potential tumor-promoting activity of bile acids in rat glandular stomach. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78: 32-39, 1987
- 67) Kobori O, Watanabe J, Shimizu T, Shoji M, Morioka Y. Enhancing effect of sodium taurocholate on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced stomach tumorigenesis in rats. *Gann* 75: 651-654, 1984
- 68) Kuwahara A, Saito Y, Kobayashi M. Bile acids promote carcinogenesis in the remnant stomach of rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 115: 423-428, 1989
- 69) 平木幹久. 残胃癌発生におよぼす胆汁の影響に関する実験的研究. *日外会誌* 92: 645-651, 1991
- 70) Silverman SJ, Andrews AW. Bile acids: co-mutagenic activity in the Salmonella-mammalian-microsome mutagenicity test: brief communication. *J Natl Cancer Inst* 59: 1557-1559, 1977

Inhibitory Effect of Thioproline on Gastric Carcinogenesis in Rats with Surgically Induced Duodenogastric Reflux Masuo Nakai, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105, 648—657 (1996)

Key words stomach neoplasms, duodenogastric reflux, endogenous nitrosation, chemoprevention, thioproline

Abstract

Rat gastric carcinoma is induced by duodenogastric reflux without application of carcinogens. This etiology is not clear, but there is a possibility that mechanisms in endogenous nitrosation may be associated with producing carcinogenic N-nitroso compounds. Ingested thioproline (TPRO) effectively traps nitrite in the alimentary tract, and its nitrosated product, N-nitrosothioproline (NTPRO), is excreted from the body in the urine. Thus urinary NTPRO is a sensitive probe for evaluating endogenous nitrosation. We investigated how ingested TPRO influences rat gastric carcinogenesis due to duodenogastric reflux. Male Wistar rats weighing 270g received a surgical procedure for the duodenal contents to flow back into the glandular stomach through the pylorus. Rats belonging to the TPRO group (n=13) were fed a special diet containing TPRO (0.5%), whereas the others belonging to the control (CNT) group (n=14) were fed a standard diet (CRF-1). The rats were given no carcinogen and were sacrificed 40 weeks after surgery. The incidence of animals bearing tumor, carcinoma and adenoma in the TPRO group was 8%, 0% and 8%, respectively, whereas that in the CNT group was 50%, 36% and 50%, respectively. Each difference was significant ($P<0.05$, respectively). These tumors located at either the prepyloric area or the gastrojejunal stoma, and demonstrated carcinoma and/or adenoma in histology. The gastric carcinomas were tubular or mucinous adenocarcinomas, and one of them invaded the liver. The urinary nitrate excretion was similar in the two groups ($4.9 \mu\text{mol/day}$ in the TPRO group and $5.7 \mu\text{mol/day}$ in the CNT group, as the median), but the urinary excretion of NTPRO in the TPRO group was significantly higher than that in the CNT group ($2.0 \mu\text{g/day}$ and less than $0.05 \mu\text{g/day}$ as the median, respectively, $P<0.01$). These results suggest that establishment of rat gastric carcinomas induced by duodenogastric reflux is associated with endogenous nitrosation.